

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
22 juillet 2004 (22.07.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/060348 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : A61K 9/08

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/003917

(22) Date de dépôt international :
26 décembre 2003 (26.12.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/16722 26 décembre 2002 (26.12.2002) FR

(71) Déposant et

(72) Inventeur : THOREL, Jean-Noël [FR/FR]; 3, rue La
Rochelle, F-75014 Paris (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : GATTO,
Hugues [FR/FR]; 1, rue du Plan de Castres, F-06570
Saint-Paul (FR).

(74) Mandataire : CABINET GERMAIN & MAUREAU;
B.P.6153, F-69466 LYON Cedex 06 (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: OPHTHALMIC AND OPHTHALMOLOGICAL USE OF A COMPLEX NUTRITIVE BASE IN AN AQUEOUS
MEDIUM

(54) Titre : UTILISATION OPHTALMIQUE ET OPHTALMOLOGIQUE D'UNE BASE NUTRITIVE COMPLEXE EN MILIEU
AQUEUX

(57) Abstract: The invention relates to a trophic composition in an aqueous medium comprising a complex nutritive base. The
aforementioned base comprises, as a minimum, multiple amino acids, vitamins, trace elements and metallic salts, and is free of any
cell growth factors, any biological extracts of animal or cell origin and any active therapeutic agents. The inventive composition is
characterised in that, in addition to the complex nutritive base, it also comprises an inhibitor of the collagenases of corneal epithelium
in humans or animals. The composition is further characterised in that it is formulated with the complex nutritive base in order to
establish a pH of between 7.3 and 7.5 and an osmolarity of between 300 and 350 m Osm.

(57) Abrégé : Composition trophique en milieu aqueux comprenant une base nutritive complexe, constituée, au moins par une mul-
tiplicité d'acides aminés, des vitamines, des oligo-éléments, et des sels métalliques, ladite base excluant tout facteur de croissance
cellulaire, tout extrait biologique d'origine animale ou cellulaire, et tout principe actif thérapeutique, ladite composition étant carac-
térisée en ce que : - outre la base nutritive complexe, elle est constituée par un inhibiteur des collagénases de l'épithélium cornéen
chez l'homme ou l'animal, et par un promoteur de la synthèse du néocollagène ; - elle est formulée, avec la base nutritive complexe,
pour établir un pH compris entre 7,3 et 7,5 et une osmolarité comprise entre 300 et 350 m Osm.

WO 2004/060348 A2

10/540979

1 JC17 Rec'd PCT/PTO 27 JUN 2005

Utilisation ophtalmique et ophtalmologique d'une base nutritive complexe en milieu aqueux

5 La présente invention concerne l'utilisation ophtalmique et ophtalmologique d'une base nutritive complexe, aussi bien chez l'homme que chez l'animal.

Par "ophtalmique" on entend qu'une base nutritive complexe telle que définie et décrite ci-après peut être mise en œuvre dans diverses applications, non thérapeutiques, en relation avec l'œil chez l'homme ou l'animal, et plus précisément en relation avec la surface extérieure ou l'extérieur de la cornée.

Par "ophtalmologique" on entend que la même base nutritive complexe peut être mise en œuvre dans le traitement thérapeutique ou clinique de l'œil chez l'homme ou l'animal, et plus précisément en application, par exemple locale, au contact extérieur de la cornée.

Plus particulièrement, aux fins des utilisations précédemment définies, la présente invention s'intéresse aux compositions trophiques comprenant une base nutritive complexe.

20 Par base nutritive complexe, on entend toute composition ou formulation, en milieu aqueux, se distinguant, comme précisé ci-après, d'un milieu de culture cellulaire, même si elle permet, en général, comme ce dernier, une culture in vitro viable pendant au moins 72 heures d'un inoculum de certaines cellules prédéterminées.

25 Différents milieux de cultures ont été effectivement décrits, et sont commercialisés. Ainsi, s'agissant de la culture in vitro de kératinocytes, on peut citer :

- BOYCE ST, HAM RG, Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in defined clonal culture and serum-free serial culture ; J. Invest. Dermatol. 1983; 81: 335-409 ;

- BOYCE ST, HAM RG, Cultivation, frozen storage, and clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in serum-free media ; J. Tissue Culture Methods 1985 ; 9 : 83-93 ;

- le milieu commercial dénommé MCDB 153, commercialisé
35 notamment par les Sociétés IRVINE SCIENTIFIC et GIBCO-BRL ;

- les milieux commerciaux dénommés DMEM (DUBECO Modified Epidermal Medium) ; KSFM de GIBCO-BRL, etc...

De tels milieux de cultures incorporent, pour être actifs, des facteurs de croissance cellulaire, soit que ces facteurs sont compris au départ
5 dans la composition du milieu de culture, soit que ces facteurs sont produits au moment de la culture, par exemple par une couche nourricière de fibroblastes, s'agissant de la culture de kératinocytes.

Une base nutritive complexe, telle que considérée selon la présente invention, ne comporte pas dans sa mise en œuvre de facteur de
10 croissance, par exemple, d'EGF (Epidermal Growth Factor).

Beaucoup des milieux de culture précédemment identifiés comportent des extraits biologiques, par exemple d'origine animale, cellulaire, ou autre, c'est-à-dire obtenus à partir d'une matière première biologique. Au rang de ces extraits biologiques, on peut citer, à titre d'exemple, tout sérum de
15 veau foetal, tout extrait de tige pituitaire de bœuf.

Par nature, ces extraits ont une composition variable, voire indéterminée.

Une base nutritive complexe, telle que considérée selon la présente invention, ne comporte aucun extrait biologique tel que défini
20 précédemment.

Ces mêmes milieux de culture précédemment identifiés comprennent, dans certains cas, différents principes actifs thérapeutiques, utilisés en tant que médicaments, et ce pour favoriser la conservation, et/ou, l'efficacité du milieu de culture.

25 Au rang de ces principes actifs, on peut citer certains antibiotiques, par exemple la pénicilline et/ou la streptomycine, seules ou en mélange, certaines hormones, par exemple la toxine cholérique, l'insuline.

Une base nutritive complexe, considérée selon la présente invention, ne comporte pas de principe actif médicamenteux.

30 De telles bases nutritives complexes, au sens où celles-ci peuvent être utilisées, seules ou en combinaison avec d'autres composants, en tant que produit actif ou comme excipient, ont été décrites dans le document WO 96/21421.

35 De telles bases nutritives complexes sont constituées en milieu aqueux par au moins, une multiplicité d'acides aminés, dont certains essentiels, différentes vitamines, des oligo-éléments, et des sels métalliques.

Conformément au document WO 96/21421, une telle base nutritive complexe a, par exemple, la composition suivante, selon Tableau 1 ci-après :

Tableau 1

5

COMPOSANTS	Concentration en mg/l
Eau	q.s.p.
Acides aminés	
L-Alanine	9,2
L-Arginine HCl	421,4
Acides aminés (suite)	
L-Asparagine (anhydre)	14,2
Acide L-aspartique	4,0
L-Cystéine HCl. H ₂ O	42,0
Acide L-glutamique	14,8
L-Glutamine	1754,4
Glycine	7,6
L-Histidine HCl. H ₂ O	50,0
L-Isoleucine	6,0
L-Leucine	131,2
L-Lysine HCl	54,0
L-Méthionine	13,5
L-Phénylalanine	10,0
L-Proline	34,6
L-Sérine	126,1
L-Thréonine	24,0
L-Tryptophane	9,3
L-Tyrosine 2 Na 2H ₂ O	11,7
L-Valine	70,3
Vitamines	
d-Biotine	0,02
Acide folique	0,80
Nicotinamide	0,04
D-Ca Pantothénate	0,30
Pyridoxine HCl	0,06
Riboflavine	0,04
Thiamine HCl	0,30
I-Inositol	18,0
Pyruvate de sodium	55,0
Thymidine	0,73
Adénine (HCl)	24,0
Acide DL-Isovalérique	0,20
Composants inorganiques	
Chlorure de sodium	6800,0
KCl	112,0
Na ₂ HPO ₄	284,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,003

COMPOSANTS	Concentration en mg/l
Acétate de sodium	300,0 (anhydre)
D-Glucose	1080,0
HEPES (pipérazine)	6600,0
Phosphoryléthanolamine	0,06768
Ethanolamine	0,04684
Sulfate de sodium	3,4
Bicarbonate de sodium	1160,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,39
MgCl ₂ .6H ₂ O	120,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	De 13,0 à 22,05
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,144
(NH ₄) ₈ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,00120
Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	0,142
Composants inorganiques (suite)	
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,00002
SnCl ₂ .2H ₂ O	0,00011
NH ₄ VO ₃	0,00057

- Conformément au document WO 02 087326, on décrit et propose une composition ophtalmique ou ophtalmologique comprenant un dérivé vitaminique, en tant qu'agent tensio-actif, non ionique, et un agent ou conservateur cationique, par exemple le polyhexaméthylène biguanide, et un agent désinfectant, par exemple du peroxyde d'hydrogène. Cette composition a essentiellement des propriétés nettoyantes et désinfectantes, mais non régénérantes au niveau de la cornée.

- Conformément au document US 5 654 266, on décrit et propose une composition essentiellement saline et tamponnée pour la conservation et le rinçage de tissus avant une transplantation, par exemple des cornées destinées à être greffées. La composition proposée comprend à titre principal du βhydroxy-butyrate, diminuant la production et l'accumulation d'acide lactique dans les tissus stockés.

- Conformément au document EP 0 517 970, on décrit et propose une solution pour l'irrigation intra-oculaire des chambres antérieure et postérieure de l'œil, à des fins de chirurgie oculaire, avec des propriétés réparatrices uniquement de l'endothélium cornéen, c'est-à-dire dans la chambre antérieure de l'œil.

- Conformément au document JP 02 083318, on décrit une composition nettoyante de l'œil comprenant des sels d'ammonium quaternaire, du chondroïtine-sulfate de sodium et de l'acide glycyrrhétinique, ainsi que des alcools, dont propylène-glycol.

Conformément au document WO 026495, on décrit une composition d'entretien d'une lentille de contact, en particulier pour son imprégnation, comprenant des vitamines, l'objectif poursuivi étant de relarguer ladite composition au contact de la cornée, à partir de la lentille de contact
5 Imprégnée.

La présente invention a pour objet l'utilisation ophtalmique ou ophtalmologique d'une base nutritive complexe telle que précédemment définie, par exemple par l'intermédiaire d'une composition trophique comprenant ladite base, en particulier pour améliorer la viabilité, par exemple
10 en cas d'agression ou de stress, et maintenir l'intégrité et l'équilibre des cellules épithéliales de la cornée de l'œil, chez l'homme ou l'animal.

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet une telle utilisation pour améliorer la viabilité, la croissance, et la différenciation des cellules de l'épithélium cornéen, chez l'homme ou l'animal.

15 Conformément à la présente invention, la composition trophique en milieu aqueux pouvant être mise en œuvre comprend :

- une base nutritive complexe, constituée, au moins, par une multiplicité d'acides aminés, des vitamines, des oligo-éléments, et des sels métalliques, ladite base excluant tout facteur de croissance cellulaire, tout
20 extrait biologique d'origine animale ou cellulaire, et tout principe actif thérapeutique,
- un inhibiteur des collagénases de l'épithélium cornéen chez l'homme ou l'animal,
- et un promoteur de la synthèse du néocollagène.

25

Préférentiellement la composition trophique est formulée, avec la base nutritive complexe, pour établir un pH compris entre 7,3 et 7,5, et une osmolarité comprise entre 300 et 350 mOsm.

30

Différents inhibiteurs de collagénase sont déjà connus, fonctionnellement et/ou chimiquement, et on se référera en particulier aux documents suivants :

- Berman; Int. Ophthalmol. Clin. 1975 Winter ; 15(4) : 49-66
- 35 - Haffner JC, Fecteau KA, Eilet H, Vet. Ophthalmol. 2003 Mar ; 6(1) : 67-72.

Différents promoteurs de la synthèse du néocollagène sont déjà connus, et on se référera en particulier aux documents suivants :

- Bellon G, Monboisse JC, Fandoux A, Borel JP, Biochim. Biophys. Acta. 1987, Aug 19, 930 (1) : 39-47

5 - Kefalides NA, Cameron JD, Tomicheck EA, Yanoff M, J Biol Chem. 1976, Feb 10 ; 251(3) : 730-3.

Selon l'invention, la composition trophique présente avantageusement les caractéristiques suivantes, ces dernières étant considérées seules ou en combinaison :

10 - l'inhibiteur des collagénases est choisi dans le groupe constitué par la cystéine, la N-acétyl cystéine, et le sel de calcium de l'EDTA ;

- l'inhibiteur des collagénases est la N-acétyl cystéine ;

- l'inhibiteur des collagénases représente au maximum 5 %, et de préférence entre 0,05 et 0,5 % en poids de ladite composition ;

15 - le promoteur de la synthèse du néocollagène est la proline ou l'hydroxyproline ;

- le promoteur de la synthèse du néocollagène représente au maximum 0,5 %, et de préférence 0,004 % en poids de ladite composition ;

20 - la composition trophique comprend de l'acide hyaluronique, et/ou un sel de l'acide hyaluronique, dans une proportion pondérale totale de la composition, au plus égale à 0,1 %, et de préférence égale à 0,07 % ;

- la composition trophique comprend un conservateur, dans une proportion pondérale de la composition, au plus égale à 0,0001 % ;

25 - le conservateur est le polyhexanide ou polyhexaméthylène biguanide (PHMB) ;

- la composition trophique répond à la formule décrite par le Tableau 2 dans la description.

Par rapport à la composition selon le tableau 1, la composition selon le Tableau 2 diffère de cette dernière sur les points suivants :

30 - elle ne comprend pas de vitamine B12, de putrescine 2HCL, de $\text{Na}_2 \text{SiO}_3$

- elle comprend, et un inhibiteur de collagénase, et un promoteur de la synthèse du néocollagène

35 - ses caractéristiques de pH et d'osmolarité permettent l'oxygénation de l'épithélium cornéen et l'activité du lysozyme des larmes.

L'invention concerne également l'utilisation d'une composition trophique telle que précédemment décrite en tant que médicament en ophtalmologie ou contactologie, chez l'homme ou l'animal, par application, par exemple locale, au contact extérieur de la cornée.

5 Elle concerne également un tel médicament, sous forme liquide, ou sous forme sèche, c'est-à-dire pour reconstitution avec un milieu aqueux.

Dans une variante, un tel médicament est sous forme liquide, par exemple sous la forme de gouttes, ou de larmes régénérantes, ou de collyre, ou de solution.

10 Ainsi, à titre d'exemple, la présente invention propose un collyre comprenant une composition trophique telle que définie précédemment, permettant de cicatriser la cornée, ou pour prévenir les adhérences conjonctivales.

Un tel collyre a les indications suivantes :

15 - ulcérations cornéennes d'origine traumatique ou autre, brûlures de la cornée ;

- prévention des adhérences conjonctivales et cornéo-conjonctivales (symblépharon) ;

- xerosis conjonctival et cornéen.

20 L'invention concerne également une solution ophtalmique, par exemple, de confort, pour application locale au contact extérieur de la cornée, chez l'homme ou chez l'animal, comprenant par exemple une composition trophique telle que précédemment définie.

25 Ainsi, la présente invention propose, par exemple, « des larmes régénérantes », comprenant une composition trophique telle que définie précédemment, pour l'hydratation de lentilles de contact et la régénération de la cornée, chez l'homme ou l'animal.

30 De telles « larmes régénérantes » lubrifient accessoirement la cornée. En définitive, elles évitent ou limitent l'érosion prématurée de la cornée, sous l'action de lentilles de contact, rigides ou semi-rigides en particulier. Et ces « larmes régénérantes » améliorent le confort visuel, et augmentent la durée de port possible de lentilles de contact.

Ainsi, la présente invention propose, par exemple, des gouttes de confort, pour les utilisations suivantes :

35 - sécheresses oculaires d'origine iatrogène (liées notamment à l'emploi de rétinoïdes topiques ou systémiques, d'antihistaminiques,

d'antiparkinsoniens, de betabloquants, de spasmolytiques, d'anxiolytiques, de neuroleptiques, d'antidépresseurs et de bronchodilatateurs, etc...), et entraînant un inconfort, en particulier chez les patients porteurs de lentilles de contact ;

- 5 - sécheresses oculaires chez les personnes âgées.

L'invention concerne également l'utilisation d'une base nutritive complexe telle que précédemment définie pour le traitement, par exemple la conservation, de pièces ou prothèses, par exemple lentilles de contact, agencées pour venir au contact par l'extérieur de la cornée oculaire, chez

- 10 l'homme ou l'animal.

Elle concerne à ce titre une solution pour la conservation, ou le stockage, ou le transport ou la mise en œuvre (par exemple chirurgicale) de pièces ou prothèses, par exemple lentilles de contact, agencées pour venir au contact par l'extérieur de la cornée oculaire, chez l'homme ou l'animal.

- 15 Grâce à une base nutritive complexe telle que précédemment définie, et en particulier à une composition trophique selon la présente invention, et comme démontré par les études exposées ci-après, les propriétés intrinsèques primaires de l'épithélium cornéen sont préservées durablement, tout en augmentant sa résistance aux agressions, et favorisant, le cas échéant,
- 20 son retour à un état d'équilibre.

La présente invention est maintenant décrite et exemplifiée, à partir d'une composition trophique en milieu aqueux, ayant la formule selon Tableau 2.

25 Tableau 2

NBRE LIGNE	DENOMINATION INTERNATIONALE NOMENCLATURE COSMETIQUE INGREDIENT (NOM INCI)	CONCENTRATION En mg/l	NBRE LIGNE	DENOMINATION INTERNATIONALE NOMENCLATURE COSMETIQUE INGREDIENT (NOM INCI)	CONCENTRATION En mg/l
1	EAU	q.s.p.	14	SODIUM PYRUVATE	55
2	CHLORURE DE SODIUM	6800	15	LYSINE HCL	54
3	GLUTAMINE	1754,4	16	HISTIDINE HCL	50
4	SODIUM BICARBONATE	1160	17	CYSTEINE HCL	42
5	GLUCOSE	1080	18	ADENINE	24
6	ARGININE HCL	421,4	19	THREONINE	24
7	SODIUM ACETATE	300	20	CHLORURE DE Ca	20,05
8	DISODIUM PHOSPHATE	284	21	INOSITOL	18
9	LEUCINE	131,2	22	ACIDE GLUTAMIQUE	14,8
10	SERINE	126,1	23	ASPARAGINE	14,2
11	CHLORURE DE Mg	120,0	24	METHIONINE	13,5
12	CHLORURE DE K	112	25	TYROSINE	11,7
13	VALINE	70,3	26	PHENYLALANINE	10,0
			27	TRYPTOPHANE	9,3

NBRE LIGNE	DENOMINATION INTERNATIONALE NOMENCLATURE COSMETIQUE INGREDIENT (NOM INCI)	CONCENTRATION En mg/l
28	ALANINE	9,2
29	GLYCINE	7,6
30	ISOLEUCINE	6,0
31	ACIDE ASPARTIQUE	4,0
32	SODIUM SULFATE	3,4
33	SULFATE FERREUX	0,003
34	ACIDE FOLIQUE	0,8
35	THYMIDINE	0,73
36	CYANOCOBALAMINE	0,41
37	CALCIUM PANTOTHENATE	0,3
38	THIAMINE HCL	0,3
39	ACIDE THIOCTIQUE	0,3
40	ZINC SULFATE	0,144
41	SODIUM SILICATE	0,142
42	PYRIDOXINE HCL	0,06
43	NIACINAMIDE	0,04
44	RIBOFLAVIN	0,3
45	BIOTIN	0,02
46	SULFATE DE CUIVRE	0,003
47	AMMONIUM MOLYBDATE	0,00120
48	AMMONIUM VANADATE	0,003
49	CHLORURE DE Mn	0,00002
50	HYALURONATE DE SODIUM	70
51	POLYHEXANIDE ou POLYHEXAMETHYLENE BIGUANIDE	0,1
52	N-ACETYL-CYSTEINE	500
53	HYDROXYPROLINE ou PROLINE	35

Conformément à la définition selon la présente invention de la composition trophique, les ingrédients en milieu aqueux de la base nutritive complexe sont tous ceux numérotés de 1 à 49, tandis que les ingrédients 50 à 53 sont considérés comme extérieurs à la base nutritive complexe, et permettent son adaptation à un contact externe avec l'épithélium de la cornée de l'œil.

Les ingrédients 50 et 51 sont optionnels, en fonction du rôle ou de la fonction recherchée pour la composition trophique.

Par ailleurs, le choix et les proportions des différents ingrédients sont définis pour établir dans la composition trophique finalement obtenue :

- un pH compris entre 7,3 et 7,5, et préférentiellement compris entre 7,42 et 7,45 (pH favorisant l'oxygénation de l'épithélium cornéen et l'activité du lyzosome des larmes).
- une osmolarité comprise entre 300 et 350 mOsm, et par exemple, égale à 340 mOsm.

Etude n°1

On évalue la biocompatibilité de la composition trophique précédemment définie sur un modèle d'épithélium de cornée humain reconstitué.

A partir de la formule selon Tableau 2, on définit et formule quatre variantes, appelées respectivement :

- EVE 1 : sans Hyaluronate de sodium (ingrédient 50) et sans conservateur (ingrédient 51).
- EVE 2 : sans Hyaluronate de sodium (ingrédient 50) et avec conservateur (ingrédient 51).
- EVE 3 : avec Hyaluronate de sodium (ingrédient 50) et sans conservateur (ingrédient 51).
- EVE 4 : Identique à la formule selon Tableau 2, et donc avec Hyaluronate de sodium (ingrédient 50), et avec conservateur (ingrédient 51).

Des ajustements minimes des autres ingrédients sont apportés, pour maintenir le pH et l'osmolarité dans les valeurs précédemment énoncées.

La cytocompatibilité des formules EVE 1 à EVE 4 est évaluée par application topique sur un modèle in vitro d'épithélium de cornée humain reconstruit, tel que disponible auprès de la Société SKINETHIC LABORATORIES, 45 Rue Saint Philippe, 06000 NICE, France.

Roger W. BEUERMAN et Lia PEDROSA ont décrit, par le détail, l'ultra-structure de la cornée humaine, dans un article intitulé « Ultra-structure of the human cornea », dans le journal « Microscopy Research and Technique », 33 : 320-335 (1996), et on s'y référera en tant que de besoin.

A partir de la structure naturelle, O. DOUCET et al. ont proposé et décrit un épithélium de cornée humaine, tridimensionnel, reconstruit, en particulier pour effectuer différents essais in vitro de toxicité ; cf. l'article ayant pour titre « A new in vitro human epithelium model for assessing the eye irritation potential of formulated cosmetic products », paru dans « In vitro and Molecular Toxicology », 11, 4 : 273-283 (1998).

Cet épithélium de cornée reconstruit, ou modèle, est obtenu par culture de cellules épithéliales de cornée, par exemple la lignée HCE, disponible et commercialisée par LSU Eye Center, Louisiana State University School of Medicine, New Orleans, Louisiana, 70112 USA. Les cellules épithéliales sont cultivées à l'interface air/liquide dans un milieu défini, et elles forment un tissu épithélial cornéen, dépourvu de stratum corneum, s'approchant de l'épithélium cornéen in vivo.

L'étude est réalisée sur de tels épithéliums cornéens reconstruits, tels qu'obtenus au 5^{ème} jour de culture (taille : 0,5 cm²), le contrôle qualité des différents épithéliums aux différents stade de culture étant assuré par la Société SKINETHIC LABORATORIES, précitée, conformément à la publication dernière citée.

Le principe du test consiste à appliquer la composition trophique directement au contact de l'épithélium cornéen reconstruit, 15 minutes trois fois par jour sur une période de 7 jours. On réalise en parallèle un témoin épithélium cornéen non traité. Chaque condition (à l'exception du témoin non traité) est réalisée en double. Aux 2^{ème}, 4^{ème} et 7^{ème} jours d'expérimentation, la viabilité cellulaire (test au MTT) est évaluée pour chacune des conditions.

En pratique, 30 µl des compositions trophiques à tester sont déposés 3 fois par jour (à 9 h, 13 h et à 17 h), directement à la surface des équivalents cornéens, pendant 15 minutes. Après cette période de contact, les compositions en excès sont éliminées et les épithéliums maintenus en

incubation à 37°C sous atmosphère humide, 5 % CO₂. Cette opération est répétée tous les jours pendant 7 jours. Aux 2^{ème}, 4^{ème} et 7^{ème} jours d'expérimentation, les épithéliums reconstruits sont prélevés pour effectuer le test de viabilité cellulaire.

Aux 2^{ème}, 4^{ème} et 7^{ème} jours d'expérimentation, les épithéliums prélevés sont rincés au PBS et placés dans 300 µl de MTT (0,5 mg/ml). Après 3 heures d'incubation à 37°C, 5 % CO₂, les épithéliums sont transférés dans 1,5 ml d'isopropanol. L'extraction du produit de clivage du MTT est réalisée sous légère agitation, pendant 2 heures à température ambiante. La densité optique à 570 nm est ensuite mesurée sur 200 µl de solution, d'extraction. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport au témoin (non traité) :

$$\% \text{ viabilité} = [\text{DO}_{(570 \text{ nm produit testé})} / \text{DO}_{(570 \text{ nm témoin})}] \times 100$$

Dans les conditions expérimentales ainsi définies, on observe un maintien total de la viabilité in vitro des épithéliums de cornée humaine reconstruits, après application topique de chacune des compositions trophiques précitées. La présence du conservateur et de l'acide hyaluronique aux concentrations d'utilisation ainsi définies n'influe pas sur la viabilité cellulaire des épithéliums qui est maintenue.

Etude n°2

Par mise en culture d'un épithélium de cornée humaine reconstitué, dans les compositions trophiques précédemment définies, on compare les résultats obtenus par rapport à ceux obtenus par mise en culture dans une solution saline tamponnée.

Le modèle d'épithélium cornéen retenu est à l'identique de celui décrit et défini dans l'Etude n°1, mis en culture pendant 72 heures dans la composition trophique étudiée.

Une seule composition trophique est retenue pour cette étude, à savoir celle définie par le Tableau 2, appelée EVE 4 dans l'Etude n°1.

Dès réception des épithéliums, le milieu nutritif de transport SKINETHIC est éliminé et remplacé, pour un des épithéliums, par 1 ml de la composition trophique étudiée. Un second épithélium est placé, pour comparaison, dans une solution saline tamponnée (Phosphate Buffered Saline, PBS, enrichi en Ca²⁺ et Mg²⁺). La cytocompatibilité de la composition

trophique étudiée a été préalablement vérifiée (absence d'effet cytotoxique, cf. Etude précédente n°1). Les épithéliums sont maintenus en incubation à 37°C sous atmosphère humide, 5 % CO₂. Les milieux sont renouvelés tous les jours. Après 3 jours de culture, les 2 épithéliums reconstruits sont prélevés pour effectuer une analyse histologique. Ils sont fixés par une solution de formaldéhyde à 10 % puis inclus dans la paraffine. L'histologie des coupes colorées à l'hématoxyline/éosine est évaluée en microscopie optique.

L'interprétation histopathologique des coupes prend en compte l'épaisseur et la régularité du tissu épithélial ainsi que la morphologie, la cohésion et la capacité des cellules à proliférer.

Concernant l'épithélium cultivé pendant 72 h dans la composition trophique, l'analyse du prélèvement montre un épithélium implanté sur le support membranaire. Il comporte 6 à 7 couches de cellules jointives (les ponts d'union sont visibles). Il n'y a pas de signe de nécrose ni de kératinisation de la couche superficielle.

Dans le cas de l'épithélium cultivé pendant 72 h dans une solution saline tamponnée, l'analyse du prélèvement montre une disparition quasi-totale de l'épithélium, seul le support est visible. Il n'y a pas de couche cellulaire identifiable.

Dans les conditions expérimentales définies pour cette étude, on observe la survie et la cohésion cellulaire d'un épithélium de cornée humaine reconstruit, mis en culture pendant 72 h dans une composition trophique selon la présente invention. En comparaison, l'expérimentation similaire réalisée avec une solution saline tamponnée montre une dégénérescence complète de l'épithélium, qui n'est plus identifiable.

Etude n°3

On évalue les propriétés cicatrisantes de compositions trophiques selon l'invention, sur un modèle de cornée humaine reconstitué.

Les quatre variantes de la composition trophique étudiée sont identiques à celles définies et décrites dans l'Etude n°1.

Le modèle d'épithélium cornéen, reconstruit, est à l'identique de celui décrit et défini dans les Etudes n°1 et n°2.

Les propriétés cicatrisantes des compositions trophiques étudiées sont évaluées après application topique sur le modèle précité, sur lequel est réalisée au préalable une lésion par altération mécanique.

La réalisation des lésions à la surface des épithéliums cornéens reconstruits est opérée à l'aide de la pointe d'un scalpel partageant sur leur diamètre chacun des épithéliums.

Le principe du test consiste à appliquer, immédiatement après le traumatisme, la composition trophique directement au contact de l'épithélium cornéen reconstruit, 15 minutes trois fois par jour, et ce quotidiennement sur une période de 9 jours. On réalise en parallèle un contrôle avec une solution saline tamponnée (PBS). Aux 2^{ème}, 4^{ème}, 7^{ème} et 9^{ème} jours d'expérimentation, l'histologie du tissu reconstruit est évaluée pour chacune des conditions. Elle est comparée à l'histologie d'une condition témoin de référence correspondant à un épithélium non agressé non traité.

En pratique, 30 µl des compositions trophiques à tester sont déposés 3 fois par jour (à 9 h, 13 h et à 17 h) directement à la surface des épithéliums cornéens pendant 15 minutes. Après cette période de contact, les compositions en excès sont éliminées et les épithéliums maintenus en incubation à 37°C sous atmosphère humide, 5 % CO₂. Cette opération est répétée tous les jours pendant 9 jours. Aux 2^{ème}, 4^{ème}, 7^{ème} et 9^{ème} jours d'expérimentation, les épithéliums reconstruits sont prélevés pour effectuer l'analyse histologique.

Aux 2^{ème}, 4^{ème}, 7^{ème} et 9^{ème} jours d'expérimentation, les épithéliums sont fixés par une solution de formaldéhyde à 10 %, puis inclus dans la paraffine. L'histologie des coupes colorées à l'hématoxyline/éosine est évaluée en microscopie optique.

L'évaluation des propriétés cicatrisantes des compositions trophiques est réalisée par analyse histologique des coupes et observation de la réparation de l'épithélium au niveau de la lésion induite par le scalpel. La localisation des lésions est effectuée par marquage à l'encre de Chine à la surface des épithéliums cornéens, avant d'effectuer la coupe histologique (coupe transversale de l'épithélium).

L'interprétation histopathologique des coupes prend en compte l'épaisseur et la régularité du tissu épithélial, ainsi que la morphologie, la cohésion et la capacité des cellules à proliférer après le traumatisme opéré.

Des photographies regroupées établissent, pour chaque condition, les coupes transversales des épithéliums réalisées en début de traitement (2^{ème} jour après réalisation de la lésion) et au dernier jour de celui-ci (9^{ème} jour).

Dans le cas du Témoin (non traité, non agressé), on observe, au 2^{ème} jour de culture, un épithélium vivace composé de 6 à 7 couches de cellules, régulières dans leur forme (aspect pavimenteux), jointives. Au 9^{ème} jour de traitement, on observe un épaissement de l'épithélium formé d'une dizaine de couches de cellules, toujours jointives et régulières. On note la présence d'une couche kératinisée en surface.

Dans le cas du traitement avec EVE 4 (composition trophique selon Tableau 2), on observe, sur la photographie prise au 2^{ème} jour, la lésion réalisée au niveau de l'épithélium, mettant à nu le support membranaire. De part et d'autre de la plaie, l'épithélium est vivace. Il n'y a pas de kératinisation. Au 9^{ème} jour de traitement, on observe au niveau du repère réalisé à l'encre de Chine, un épithélium réparé, continu, formé de plusieurs couches de cellules relativement régulières (d'aspect plus arrondi que dans le cas du Témoin), non nécrosées. On note la présence d'une zone de kératinisation dans les couches superficielles.

Dans le cas du traitement avec une solution saline tamponnée (PBS), on visualise au 2^{ème} jour la zone lésée, marquée par une perte de substance importante au niveau de l'épithélium. Au 9^{ème} jour, on observe au niveau du repère un épithélium réparé, constitué de 5 à 6 couches de cellules seulement, d'aspect arrondi, turgescents pour certaines, avec la présence de vacuoles.

Dans le cas du traitement avec les compositions dites EVE 1, EVE 2, EVE 3, on observe, pour les prélèvements réalisés au 2^{ème} jour d'expérimentation, la lésion repérée par une perte de substance totale. De part et d'autre, l'épithélium est pluristratifié, vivace et non kératinisé.

Au 9^{ème} jour, pour la formulation EVE 1, on observe un épithélium reconstitué, continu, formé de cellules arrondies, assez régulières avec présence de quelques vacuoles. Pour les formulations EVE 2 et EVE 3, les épithéliums ont un aspect identique, avec des cellules jointives et de morphologie régulière.

Cependant, l'épaisseur des épithéliums apparaît plus mince par rapport à celle des épithéliums traités par la formulation EVE 4.

Dans les conditions expérimentales ainsi définies, on observe pour chacune des conditions testées une réparation des épithéliums de cornée humains préalablement lésés, au terme des traitements.

La formulation EVE 4 (contenant acide hyaluronique et conservateur) permet d'obtenir les meilleurs résultats. L'épithélium réparé est continu, vivace, pluristratifié, composé de cellules jointives et régulières.

Etude n°4

On évalue les propriétés cicatrisantes de compositions trophiques selon la présente invention, en comparaison avec une solution saline tamponnée.

La composition trophique étudiée est à l'identique de celle définie par le Tableau 2.

Le modèle d'épithélium cornéen, reconstruit, est à l'identique de celui mis en œuvre dans les Etudes n°s 1 à 3.

Les propriétés cicatrisantes des compositions trophiques sont évaluées par application topique sur un modèle *in vitro* d'épithélium de cornée humaine reconstruit, sur lequel est réalisée, au préalable, une lésion par traumatisme mécanique.

La réalisation des lésions à la surface des épithéliums cornéens reconstruits est opérée à l'aide de la pointe d'un scalpel partageant sur leur diamètre chacun des épithéliums.

Le principe du test consiste à appliquer, immédiatement après le traumatisme, la composition trophique directement au contact de l'épithélium cornéen reconstruit, 15 minutes trois fois par jour, et ce quotidiennement sur une période de 7 jours. On réalise en parallèle un contrôle en solution saline tamponnée (PBS enrichi en Ca^{2+} et Mg^{2+}). Aux 2^{ème}, 4^{ème} et 7^{ème} jours d'expérimentation, l'histologie du tissu reconstruit est évaluée pour chacune des conditions. Elle sera comparée à l'histologie d'une condition témoin de référence correspondant à un épithélium non agressé non traité.

En pratique, 30 μl des compositions à tester sont déposés 3 fois par jour (à 9 h, 13 h et à 17 h) directement à la surface des équivalents cornéens pendant 15 minutes. Après cette période de contact, les compositions en excès sont éliminées et les épithéliums maintenus en incubation à 37°C sous atmosphère humide, 5 % CO_2 . Cette opération est répétée tous les jours pendant 7 jours. Aux 2^{ème}, 4^{ème} et 7^{ème} jours d'expérimentation, les épithéliums reconstruits sont prélevés pour effectuer l'analyse histologique.

Aux 2^{ème}, 4^{ème} et 7^{ème} jours d'expérimentation, les épithéliums sont fixés par une solution de formaldéhyde à 10 % puis inclus dans la paraffine. L'histologie des coupes colorées à l'hématoxyline/éosine est évaluée en microscopie optique.

L'évaluation des propriétés cicatrisantes des compositions trophiques est réalisée par analyse histologique des coupes et observation de la réparation de l'épithélium au niveau de la lésion induite par le scalpel. La localisation des lésions est effectuée par marquage à l'encre de Chine à la surface des épithéliums de cornée avant d'effectuer la coupe histologique (coupe transversale de l'épithélium).

L'interprétation histopathologique des coupes prend en compte l'épaisseur et la régularité du tissu épithélial ainsi que la morphologie, la cohésion et la capacité des cellules à proliférer après le traumatisme opéré.

Des photographies établissent, pour chaque condition, les coupes transversales des épithéliums réalisées aux différentes étapes du traitement.

Dans le cas du Témoin (non traité, non agressé), on observe, au 2^{ème} jour de culture, un épithélium vivace composé de 6 à 7 couches de cellules, régulières dans leur forme (aspect pavimenteux), jointives. Au 7^{ème} jour de traitement, on observe un épaississement de l'épithélium formé d'une dizaine de couches de cellules, toujours jointives et régulières. On note la présence d'une couche kératinisée en surface.

Dans le cas du traitement avec la composition trophique selon tableau 2, on observe, sur la photographie prise au 2^{ème} jour, la lésion réalisée au niveau de l'épithélium mettant à nu le support membranaire. De part et d'autre de la plaie, l'épithélium est vivace. Il n'y a pas de kératinisation. Au 4^{ème} jour, on observe une recolonisation cellulaire du support. L'épithélium comporte 3 à 4 couches de cellules dont certaines sont en division. Au 7^{ème} jour de traitement, on observe au niveau du repère réalisé à l'encre de Chine, un épithélium réparé, continu, formé de plusieurs couches de cellules relativement régulières (d'aspect plus arrondi que dans le cas du Témoin), non nécrosées. On note la présence d'une zone de kératinisation dans les couches superficielles.

Dans le cas du traitement avec une solution saline tamponnée (PBS), on visualise au 2^{ème} jour la zone lésée marquée par une perte de substance importante au niveau de l'épithélium. Au 4^{ème} jour, l'épithélium se reconstitue, composé seulement d'une à deux couches de cellules arrondies.

Au 7^{ème} jour, l'épithélium est réparé, constitué de 5 à 6 couches de cellules, d'aspect arrondi, turgescentes pour certaines, avec la présence de vacuoles.

Dans les conditions expérimentales ainsi définies, la composition trophique permet la reconstitution d'un épithélium de cornée humain préalablement lésé. L'épithélium réparé est continu, vivace, pluristratifié, composé de cellules jointives et régulières.

L'application d'une solution saline tamponnée permet également une réparation de l'épithélium. Celui-ci n'est cependant formé que de 3 à 4 couches de cellules, témoin d'une régénération inférieure à celle observée avec la composition trophique. D'autre part, les cellules sont arrondies avec présence de nombres vacuoles.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'une base nutritive complexe en milieu aqueux, constituée au moins par une multiplicité d'acides aminés, des vitamines, des oligo-éléments, et des sels métalliques, ladite base excluant tout facteur de croissance cellulaire, ou tout extrait biologique d'origine animale ou cellulaire, ou tout principe actif médicamenteux, en tant que médicament ophtalmologique, ou solution ophtalmique, pour une application au contact extérieur de l'œil chez l'homme ou l'animal.

2. Utilisation d'une base nutritive complexe en milieu aqueux, constituée au moins par une multiplicité d'acides aminés, des vitamines, des oligo-éléments, et des sels métalliques, ladite base excluant tout facteur de croissance cellulaire, ou tout extrait biologique d'origine animale ou cellulaire, ou tout principe actif médicamenteux, en tant que produit de traitement pour le stockage, ou la conservation, ou le transport ou la mise en œuvre de pièces ou prothèses, par exemple lentilles de contact, agencées pour venir au contact de l'extérieur de la cornée de l'œil, chez l'homme ou l'animal.

3. Utilisation selon la revendication 1, caractérisé en ce que le médicament ophtalmologique ou solution ophtalmologique consiste en une composition trophique en milieu aqueux comprenant la base nutritive complexe, un inhibiteur des collagenases de l'épithélium cornéen chez l'homme ou l'animal, et un promoteur de la synthèse du néocollagène.

4. Utilisation selon la revendication 2, caractérisé en ce que le produit de traitement consiste en une composition trophique en milieu aqueux comprenant la base nutritive complexe, un inhibiteur des collagenases de l'épithélium cornéen chez l'homme ou l'animal, et un promoteur de la synthèse du néocollagène.

5. Utilisation selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en ce que la composition trophique est formulée pour établir un pH compris entre 7,3 et 7,5 et une osmolarité comprise entre 300 et 350 Osm.

6. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'inhibiteur des collagenases est choisi dans le groupe constitué par la cystéine, la N-acétyl cystéine, et le sel de calcium de l'EDTA.

7. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'inhibiteur des collagenases est la N-acétyl cystéine.

8. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'inhibiteur des collagénases représente au maximum 5 %, et de préférence entre 0,05 et 0,5 % en poids de la composition trophique.

9. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que le promoteur de la synthèse du néocollagène est la proline ou l'hydroxyproline.

10. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que le promoteur de la synthèse du néocollagène représente au maximum 0,5 %, et de préférence 0,004 % en poids de la composition trophique.

11. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comprend de l'acide hyaluronique, et/ou un sel de l'acide hyaluronique, dans une proportion pondérale totale de la composition trophique, au plus égale à 0,1 %, et de préférence égale à 0,07 %.

12. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que la composition trophique comprend un conservateur, dans une proportion pondérale de ladite composition, au plus égale à 0,0001 %.

13. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que le conservateur est le polyhexanide ou polyhexaméthylène biguanide.

14. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que la composition trophique répond à la formule décrite par le Tableau 2 dans la description.

15. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le médicament ophtalmologique ou la solution ophtalmologique est sous forme liquide, ou sous forme sèche, c'est-à-dire pour reconstitution avec un milieu aqueux.

16. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que le produit de traitement est sous forme liquide, ou sous forme sèche, c'est-à-dire pour reconstitution avec un milieu aqueux.

17. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le médicament ophtalmologique ou la solution ophtalmologique est sous la forme de gouttes ou de larmes régénérantes, ou de gouttes de confort, ou de collyre, ou de solution.

18. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la solution ophtalmique est une solution de confort

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D Internationale No
PCT/FR 03/03917

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7	A61K9/08	A61K31/728	A61K47/02	A61K47/18	A61K31/401
	A61K9/00	A61L12/14	A61P27/02	A61K47/36	

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WO 96/21421 A (SOC D EXPL FRANCAISE DES RECH ;GATTO HUGUES (FR); THOREL JEAN NOEL) 18 juillet 1996 (1996-07-18) cité dans la demande le document en entier revendications 1-5,13-16,21,22; exemple 1</p> <p style="text-align: center;">----- -/-</p>	<p>1-13, 15-18</p>

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 juillet 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

12/08/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Luangkhot, N

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D Internationale No
PCT/FR 03/03917

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,Y A	WO 02/087326 A (ALLERGAN INC) 7 novembre 2002 (2002-11-07) le document en entier page 1, ligne 3-16 page 4, ligne 12-14 page 6, ligne 22,23 page 7, ligne 3-14 page 8, ligne 24 - page 10, ligne 32 page 18, ligne 1-12 page 18, ligne 26 - page 19, ligne 22 page 26, ligne 11-15 page 27, ligne 14 page 28, ligne 20,28-30 page 29, ligne 1-10 exemple 4 revendications 1,3,6,8,9,13-21	1-13, 15-18 14
X,Y A	US 5 654 266 A (CHEN CHUNG-HO ET AL) 5 août 1997 (1997-08-05) le document en entier colonne 1, ligne 15-17 colonne 3, ligne 28-30 colonne 4, ligne 32 colonne 6, ligne 17-35 colonne 8 revendications 3,4,8,11,16,17	1-13, 15-18 14
X,Y A	EP 0 517 970 A (LINDSTROM RICHARD L ;SKELNIK DEBRA L (US)) 16 décembre 1992 (1992-12-16) le document en entier page 1; tableau B page 4, ligne 20-28 page 6, ligne 15-24 page 8, ligne 43 - page 9, ligne 19 page 10, ligne 9-17 revendications 1-7 page 2, ligne 41,48	1-13, 15-18 14
X,Y A	DATABASE WPI Section Ch, Week 199018 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 1990-135663 XP002252714 & JP 02 083318 A (ZERIA SHINYAKU KOGYO KK) 23 mars 1990 (1990-03-23) abrégé	1-13, 15-18 14
X,Y A	WO 02/060495 A (WAGENAAR LOUIS JOHAN) 8 août 2002 (2002-08-08) le document en entier page 6, ligne 21 page 7, ligne 20 - page 8, ligne 10 page 2, ligne 14-17 page 3, ligne 3-37	1-13, 15-18 14

-/-

D. Internationale No
PCT/FR 03/03917

Formulaire PCT/BA/210 (suite de la deuxième feuille) (Janvier 2004)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ernationale No
PCT/FR 03/03917

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BERMAN M B: "COLLAGENASE INHIBITORS: RATIONALE FOR THEIR USE IN TREATING CORNEAL ULCERATION" INTERNATIONAL OPHTHALMOGY CLINICS, LITTLE, BROWN AND CO., BOSTON, US, vol. 15, no. 4, janvier 1975 (1975-01), pages 49-66, XP008011256 ISSN: 0020-8167 cité dans la demande abrégé	14
Y	le document en entier	1-13, 15-18
A	BELLON G ET AL: "EFFECTS OF PREFORMED PROLINE AND PROLINE AMINO ACID PRECURSORS INCLUDING GLUTAMINE ON COLLAGEN SYNTHESIS IN HUMAN FIBROBLAST CULTURES" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 930, no. 1, 1987, pages 39-47, XP002290392 ISSN: 0006-3002 cité dans la demande le document en entier abrégé	14
Y		1-13, 15-18
X,Y	US 6 194 457 B1 (DUARTE ALEX ET AL) 27 février 2001 (2001-02-27)	1-13, 15-18
A	le document en entier colonne 1, ligne 40 - colonne 3, ligne 17; revendications 1,12; exemple 1	14
Y	VARMA S D: "SCIENTIFIC BASIS FOR MEDICAL THERAPY OF CATARACTS BY ANTIOXIDANTS" AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION, BETHESDA, MD, US, vol. 53, no. 1, SUPPL, 1991, pages 335S-345S, XP009003151 ISSN: 0002-9165 le document en entier abrégé	1-13, 15-18

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.1

Bien que la revendication 1 concerne une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/a la composition.

Suite du cadre I.1

Règle 39.1(iv) PCT - Méthode de traitement thérapeutique du corps humain ou animal

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ande internationale n°
PCT/FR 03/03917

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°^{es} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:

Bien que la revendication 1 concerne une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/a la composition.
2. ☐ Les revendications n°^{es} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°^{es} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☒ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°^{es}
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°^{es}

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Internationale No
PCT/FR 03/03917

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9621421	A	18-07-1996	FR 2729081 A1	12-07-1996
			FR 2729076 A1	12-07-1996
			AT 198039 T	15-12-2000
			AU 4492096 A	31-07-1996
			DE 69611230 D1	18-01-2001
			DE 69611230 T2	05-04-2001
			EP 0802784 A1	29-10-1997
			ES 2153559 T3	01-03-2001
			WO 9621421 A1	18-07-1996
			JP 10512253 T	24-11-1998
			US 2002034499 A1	21-03-2002
WO 02087326	A	07-11-2002	US 2003068250 A1	10-04-2003
			BR 0209317 A	20-07-2004
			CA 2446491 A1	07-11-2002
			EP 1383377 A1	28-01-2004
			WO 02087326 A1	07-11-2002
US 5654266	A	05-08-1997	US 5298487 A	29-03-1994
EP 0517970	A	16-12-1992	EP 0517970 A1	16-12-1992
JP 2083318	A	23-03-1990	AUCUN	
WO 02060495	A	08-08-2002	CA 2434242 A1	08-08-2002
			EP 1347787 A1	01-10-2003
			WO 02060495 A1	08-08-2002
			US 2004057980 A1	25-03-2004
FR 2425858	A	14-12-1979	FR 2425858 A1	14-12-1979
JP 2002020279	A	23-01-2002	AUCUN	
EP 0698388	A	28-02-1996	IT RM940485 A1	25-01-1996
			AT 187637 T	15-01-2000
			CA 2154533 A1	26-01-1996
			CZ 9501913 A3	14-02-1996
			DE 69513902 D1	20-01-2000
			DE 69513902 T2	18-05-2000
			DK 698388 T3	08-05-2000
			EP 0698388 A1	28-02-1996
			ES 2142976 T3	01-05-2000
			GR 3032958 T3	31-07-2000
			JP 8169835 A	02-07-1996
			PL 309753 A1	05-02-1996
			PT 698388 T	31-05-2000
			US 5770628 A	23-06-1998
			ZA 9506165 A	07-03-1996
EP 0468122	A	29-01-1992	FR 2644060 A1	14-09-1990
			EP 0468122 A1	29-01-1992
WO 9415649	A	21-07-1994	AU 723810 B2	07-09-2000
			AU 5992594 A	15-08-1994
			BR 9405653 A	14-11-1995
			CA 2152962 A1	21-07-1994
			CN 1116407 A ,B	07-02-1996
			DE 69414836 D1	07-01-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

internationale No
PCT/FR 03/03917

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9415649	A		DE 69414836 T2	17-06-1999
			EP 0690728 A1	10-01-1996
			ES 2125435 T3	01-03-1999
			JP 8507701 T	20-08-1996
			JP 3452572 B2	29-09-2003
			MX 9400301 A1	31-08-1994
			WO 9415649 A1	21-07-1994
			US 5453435 A	26-09-1995
US 5942218	A	24-08-1999	AT 168530 T	15-08-1998
			CA 2163791 A1	08-12-1994
			DE 59406509 D1	27-08-1998
			WO 9427440 A1	08-12-1994
			EP 0700249 A1	13-03-1996
			ES 2122288 T3	16-12-1998
			JP 8510454 T	05-11-1996
US 2002049281	A1	25-04-2002	AU 773628 B2	27-05-2004
			AU 2307200 A	25-08-2000
			BR 0007985 A	06-11-2001
			CA 2362233 A1	10-08-2000
			CN 1342170 T	27-03-2002
			DE 1163274 T1	14-11-2002
			EP 1163274 A1	19-12-2001
			ES 2181607 T1	01-03-2003
			WO 0046252 A1	10-08-2000
			JP 2002536465 T	29-10-2002
			NZ 512994 A	28-11-2003
			US 2004127699 A1	01-07-2004
US 6194457	B1	27-02-2001	EP 0895474 A1	10-02-1999
			JP 2001504132 T	27-03-2001
			WO 9832435 A1	30-07-1998